

学位論文要旨

肺動脈性肺高血圧症ラットの右心不全発症・進展における
細胞外マトリックス関連タンパク質と線維芽細胞の役割解明

Elucidation of the role of extracellular matrix-related proteins and
fibroblasts on initiation and progression of right heart failure in
pulmonary arterial hypertensive rats

北里大学大学院獣医学系研究科

獣医学専攻 博士課程

井本 圭亮

Keisuke Imoto

指導教授 山脇 英之

肺動脈性肺高血圧症(pulmonary arterial hypertension: PAH)は肺動脈圧亢進を臨床所見とする難治性呼吸器疾患である。PAH患者の多くは致死的な右心不全を発症するが、その発症・進展機構には未だ不明な点が多い。組織の構造支持体である細胞外マトリックス(extracellular matrix: ECM)は様々な細胞機能を調節する。近年、ECM分解断片群 matricryptins や分泌型 ECM 成分 matricellular proteins などの ECM 関連タンパク質と心疾患との関連が示唆されている。しかしながら、PAH 誘発右心不全における ECM 関連タンパク質の役割は現在ほとんど明らかにされていない。本研究は、ECM 関連タンパク質を介した右心不全の発症・進展機構を解明し、新規 PAH 誘発右心不全治療薬の標的因子を探索することを目的とした。

1. XVIII 型コラーゲン分解断片 endostatin は右心室心筋細胞の T 型 Ca^{2+} チャンネル活性抑制を介して PAH 誘発右心不全を改善する

胎児型遺伝子である T 型 Ca^{2+} チャンネル(T-type Ca^{2+} channel: TTCC)は様々な心疾患において心筋細胞に再発現し、心肥大や不整脈の発症要因となる。当研究室ではこれまでに、XVIII 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の C 末端分解断片 endostatin がモルモット単離心室筋細胞の TTCC 活性を抑制することを明らかにした。そこで第一章では monocrotaline (MCT)誘導性 PAH モデルラットの右心室心筋細胞に再発現した TTCC 活性に及ぼす endostatin の影響と small interfering (si)RNA による endostatin 発現抑制が PAH モデルラットの右心不全発症・進展に及ぼす影響を検討した。Endostatin は右心室単離心筋細胞の TTCC 電流を有意に抑制した。Endostatin 発現を抑制した PAH モデルラットでは生存率が低下し、右心室重量増加や右心機能低下

の亢進、右心室組織構造の顕著なリモデリングが認められた。本章で初めて明らかにしたこれらの知見は、endostatin が TTCC 活性抑制を介して心保護的に働く可能性を提示するものである (*Pflugers Arch.* 2016)。

2. PAH モデルラットの右心室における matricellular proteins の発現動態

PAH 誘発右心不全における発現動態が不明な matricellular proteins は数多く残されている。そこで第二章では、右心肥大期の MCT (2 週) 投与ラット及び右心不全発症期の MCT (3 週) 投与ラットの右心室における各種 matricellular proteins mRNA 発現変化を Real-time PCR により解析した。MCT (2 週) 投与ラットの右心室では SPARC ファミリー、thrombospondin (TSP) ファミリー、CCN ファミリー、tenascin C、periostin (POSTN) 及び osteopontin の mRNA 発現が有意に増加した。一方、MCT (3 週) 投与ラットの右心室では、TSP-4、CCN5 及び POSTN の mRNA 発現が持続して亢進した。これら matricellular proteins 発現変化に関する知見は、PAH 誘発右心不全の発症・進展機構の解明に役立つことが期待される (*J. Vet. Med. Sci.* 2017)。

3. PAH モデルラットにおける右心室由来線維芽細胞 (right ventricular fibroblast: RVFb) の形質転換

心疾患の発症・進展には心線維芽細胞の形質転換が密接に関連するが、PAH 誘発右心不全における RVFb の形質変化は不明である。そこで第三章では、MCT (2 週) 投与ラットの RVFb (MCT-RVFb) の形

質変化と、その調節機構を検討した。MCT-RVFb では筋線維芽細胞マーカー(α -smooth muscle actin 及び collagen type I)発現が減少したが、細胞増殖、遊走及び matrix metalloproteinase (MMP)-9 産生能が有意に亢進した。各種阻害薬を用いた検討により、MCT-RVFb の細胞増殖能亢進には extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 の活性化が、細胞遊走能亢進には store-operated Ca^{2+} entry (SOCE)/ Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)シグナル経路と ERK1/2 の活性化を介して産生誘導される MMP-9、さらに SOCE/CaMKII/c-Jun N-terminal kinase シグナル経路の活性化が関わることを解明した。本章では、MCT-RVFb が細胞増殖、遊走能の亢進した炎症性形質であることを初めて明らかにした(*Pflugers Arch.* 2018)。

4. POSTN は RVFb の inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS)発現誘導を介して右心収縮機能障害に関与する

心臓における iNOS 発現と NO 産生の亢進は、心収縮機能障害の要因となる。そこで第四章では、MCT 誘導性 PAH モデルラットにおいて、POSTN が RVFb の iNOS 発現と NO 産生を亢進し、RVFb 由来 NO が心筋細胞の L 型 Ca^{2+} チャネル(L-type Ca^{2+} channel: LTCC)活性抑制を介して心収縮機能の障害に関わるとの仮説を検証した。MCT (3 週)投与ラットの右心室では心筋細胞における POSTN タンパク質発現と間質の線維芽細胞における iNOS タンパク質発現が有意に亢進した。また MCT-RVFb では iNOS 発現が有意に亢進した。POSTN 組換えタンパク質は RVFb の iNOS 発現と NO 産生を亢進した。POSTN で刺激した RVFb の培養上清は、H9c2 心筋芽細胞におい

て LTCC を介した Ca^{2+} 流入を有意に抑制した。本章の結果から、MCT 誘導性 PAH モデルラットの右心室において発現が亢進した POSTN は、RVFb の iNOS 発現と NO 産生を亢進することで心筋細胞の LTCC 活性を抑制し、心収縮機能を障害する可能性が考えられた (*Int. J. Mol. Sci.* 2019)。

PAH 誘発右心不全において、endostatin は心筋細胞の LTCC 活性抑制を介して心保護的に働くことが示唆された。また、PAH モデルラットの右心室では様々な *matricellular proteins* の mRNA 発現が変化し、RVFb の炎症性形質への転換が認められた。とりわけ POSTN は RVFb の iNOS 発現と NO 産生の亢進を介した LTCC 活性抑制により右心収縮機能障害の要因となる可能性が考えられた。本研究で明らかにした新たな知見は、ECM 関連タンパク質と心線維芽細胞を標的とした PAH 誘発右心不全の新規治療法の開発に貢献することが大いに期待される。